

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 11 月 7 日 (07.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/088182 A1(51) 国際特許分類: C07K 14/47, 14/705,
C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/18, C12N 5/10, G01N
33/15, 33/50, C12Q 1/68, A61K 38/17, 31/711, A61P
3/00, 5/00, 9/00, 25/00, 35/00行 (MIYAJIMA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県
つくば市 吾妻 4 丁目 1 6-4-4 0 3 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04215

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);
〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-
aka (JP).

(22) 国際出願日: 2002 年 4 月 26 日 (26.04.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-132201 2001 年 4 月 27 日 (27.04.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 守谷 岳郎
(MORIYA, Takeo) [JP/JP]; 〒562-0001 大阪府 箕
面市 箕面 8 丁目 1 2-6 Osaka (JP). 伊藤 隆司
(ITO, Takashi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市
春日 1 丁目 7 番地 9-7 0 4 号 Ibaraki (JP). 新谷 靖
(SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒560-0005 大阪府 豊中
市 西緑丘 2 丁目 9 番 1-5 0 1 号 Osaka (JP). 宮嶋 伸添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質およびその DNA

(57) Abstract: A mouse-origin protein and a polynucleotide encoding the same which are usable in: (1) determining a ligand to this protein; (2) preventives and/or remedies for diseases relating to the hypofunction of the above protein; (3) screening a compound (an agonist, an antagonist and so on) capable of altering the binding properties of the above protein to a ligand; etc.

(57) 要約:

WO 02/088182 A1

本発明のマウス由来の蛋白質またはそれをコードするポリヌクレオチドは、
 (1) 本発明の蛋白質に対するリガンドの決定、(2) 本発明の蛋白質の機
 能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3) 本発明の蛋白質
 とリガンドとの結合性を変化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニストな
 ど) のスクリーニングなどに用いることができる。

明 細 書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

5 技術分野

本発明は、マウス脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAに関する。

背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていること
- 15 ことから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7 TMR)と総称される。

- G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。
- 20

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の臓器や細胞の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。
- 25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。

生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

- 5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを含む医薬品開発に非常に重要な手段である。しかし従来は、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。
- 10

また、近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

15

従来、G蛋白質共役型レセプターとそのリガンドである生理活性物質との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

20

25

しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、またそのリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たなリガンド（生理活性物質）の探索、また、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物を使用する実験）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。すなわち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させ

る化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

10 発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、マウス脳由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が図1に示される疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

20 (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(2) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

25 (3) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

(4) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、

- (6) 配列番号：2 で表される塩基配列を有する上記 (5) 記載のポリヌクレオチド、
- (7) 上記 (4) 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- (8) 上記 (7) 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- 5 (9) 上記 (8) 記載の形質転換体を培養し、上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
- (10) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
- 10 (11) 上記 (4) 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (12) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (13) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記 (12) 記載の抗体、
- 15 (14) 上記 (12) 記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (15) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、
- (16) 上記 (15) 記載のリガンドを含有してなる医薬、
- 20 (17) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- (18) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記 (1) 記載
- 25 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (19) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩とリガンドとの結合性を

変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- (20) 上記 (18) 記載のスクリーニング方法または上記 (19) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(21) 上記 (18) 記載のスクリーニング方法または上記 (19) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (22) 上記 (4) 記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(23) 上記 (4) 記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

- (24) 上記 (4) 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の mRNA の定量方法、

(25) 上記 (12) 記載の抗体を用いることを特徴とする上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法、

- (26) 上記 (24) または上記 (25) 記載の定量方法を用いることを特徴とする上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法、

(27) 上記 (24) 記載の定量方法を用いることを特徴とする上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (28) 上記 (25) 記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(29) 上記 (27) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物または

その塩、

(30) 上記 (28) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩、

- 5 (31) 上記 (27) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (32) 上記 (28) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- 10

(33) 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌または心疾患の予防・治療剤である上記 (21)、上記 (31) または上記 (32) のいずれかに記載の医薬、

- (34) 哺乳動物に対して、上記 (20)、上記 (29) または上記 (30) のいずれかに記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする、
- 15 該哺乳動物における中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌または心疾患の予防・治療方法、

(35) 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌または心疾患の予防・治療剤を製造するための、上記 (20)、上記 (29) または上記 (30) のいずれかに記載の化合物またはその塩の使用等に関する。

- 20 さらには、

- (36) ①配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列、②配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1～5 個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列に 1
- 25 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1～5 個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、④配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは 1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1～5 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤

それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(37) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(17)記載のリガンドの決定方法、

(38) リガンドが、例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カンナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP (例、PACAP 27、PACAP 38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテステイナル ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー (例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン1-リン酸、リゾホスファチジルセリン、スフィンゴシルホスホリルコリン、リゾホスファチジルコリン、ステロイド類、胆汁酸類、イソプレノイド、アラキドン酸代謝物、アミン類、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である上記(37)記載のリガンドの決定方法、

(39) (i) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、

(ii) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記 (18) 記載のスクリーニング方法、

(40) (i) 標識したリガンドを上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(41) (i) 標識したリガンドを上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(42) (i) 標識したリガンドを上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(43) (i) 標識したリガンドを上記 (8) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記 (8) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した
5 G蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (44) (i) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記
15 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(45) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記 (8) 記載の形質転換体を培養することによって該形質
20 転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記 (7) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質
25 に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(46) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合

物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カンナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸、リゾホスファチジルセリン、スフィンゴシルホスホリルコリン、リゾホスファチジルコリン、ステロイド類、胆汁酸類、イソプレノイド、アラキドン酸代謝物、アミン類、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である上記（44）または（45）記載のスクリーニング方法、

25 (47) 上記（39）～（46）記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

 (48) 上記（39）～上記（46）記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との

結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(49) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記 (19) 記載のスクリーニング用キット、

5 (50) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記 (19) 記載のスクリーニング用キット、

(51) 上記 (8) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記 (19) 記載のスクリーニング用キット、

10 (52) 上記 (49) ~ (51) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(53) 上記 (49) ~ (51) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

15 (54) 上記 (12) 記載の抗体と、上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記 (1) の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

20 (55) 上記 (12) 記載の抗体と、被検液および標識化された上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記 (1) 記載
25 の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (3) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

(56) 被検液と担体上に不溶化した上記 (12) 記載の抗体および標識化された上記 (12) 記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記 (1) 記

載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法等を提供する。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、TGR38の疎水性プロット図である。

発明を実施するための最良の形態

- 10 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質(以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある)は、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

- 本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、
15 繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立
20 腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来する蛋白質であつてもよく、また合成蛋白質であつてもよい。

配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%

以上、なかでも好ましくは約 90%以上、最も好ましくは約 95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

該活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約 0.01～100 倍、好ましくは約 0.5～20 倍、より好ましくは約 0.5～2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1～5 個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1～5 個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1～5 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質のアミノ酸配列は、ペプチド標記の慣例に従って、左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C 末端がカルボキシ

ル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート ($-\text{COO}^-$)、アミド ($-\text{CONH}_2$) またはエステル ($-\text{COOR}$) のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などが用いられる。

10 本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシ基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシ基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などが用いられる。

25 本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質の活性を有するものなどが用いられる。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、例えばリガンド結合活性を示す。
リガンド結合活性の測定は上記と同様に行なうことができる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター
蛋白質の部分ペプチドとしては、図1に示される疎水性プロット解析におい
5 て細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含む
ペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも
同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得
るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでもよい。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸配列におけるアミノ酸数は、上記した本
10 発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好
ましくは50個以上、より好ましくは100個以上である。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好
ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%
以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を
15 有するアミノ酸配列を示す。

また、本発明の部分ペプチドのアミノ酸配列において、①上記アミノ酸配
列中の1または2個以上（好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個
（1～5個））のアミノ酸が欠失していてもよく、②上記アミノ酸配列に1
または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、
20 さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加していてもよく、③
上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より
好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ
酸で置換されていてもよい。さらに、これら①ないし③から選ばれる任意の
2種以上が適宜組み合わせられていてもよい。

25 また、本発明の部分ペプチドのC末端は、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カル
ボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の
いずれであってもよい（Rは前記と同意義を示す）。本発明の部分ペプチド
がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場
合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の

部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその塩をヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などでの抽出を行ない、該抽出液をクロマトグラフィー（例、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、あるいはこれらの組み合わせ等）に付すことによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の製造には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチ

ル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリ
5 アクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などが挙げられる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質またはペプチドのアミノ酸配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合
10 させる。反応の最後に樹脂から蛋白質またはペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質もしくは部分ペプチドまたはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類が好ましい。カル
15 ボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これら活性化試薬を用いる場合、ラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルと
20 してあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することにより、アミノ酸の縮合が行われる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒は、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロ
25 リドンなどの酸アミド類；塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類；トリフルオロエタノールなどのアルコール類；ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類；ピリジンなどのアミン類；ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類；アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類；酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類；あるいはこれらの

適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰量で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂

-Bz 1、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元；無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理；ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理；液体アンモニア中ナトリウムによる還元などが用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の

手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る方法としては、例えば、まず、C末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護し、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる方法も挙げられる。縮合は上記と同様にして行われる。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質を、既知の各種精製手段を用いて精製し、主要画分を凍結乾燥することによって所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、C末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合させてアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体の場合と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のレセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法などが挙げられる。例えば、本発明のレセプター蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより、目的とする部分ペプチドを製造することができる。ここで、縮合や保護基の脱離は、例えば、以下の①～⑤に記載された方法にしたがって行われる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

②Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学 IV、205、

(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、このようにして得られた部分ペプチドは、通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再
5 結晶あるいはこれらの組み合わせによって精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記
10 した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられる。これらは、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはD
15 NA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、公知の方法、例えば実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法
20 またはそれに準じた方法、具体的にはTaqMan PCRなどの方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAなどが挙げられる。ライ
25 ブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、該DNAは、上記した細胞・組織より調製した全RNAまたはmRNA画分を用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAなどが挙げられる。

配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことが好ましい。

ここで、ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の条件が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製または発

現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。また、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳終止コドン、蛋白質コード領域、ORF 翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンδροーム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、即ち、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチド（アンチセンス核酸）としては、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖D

NA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドのいずれであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）または公知の修飾の付加されたポリヌクレオチド〔例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの〔例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）〕〕のいずれであってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」は、プリンおよびピリミジン塩基以外に、修飾された複素環型塩基（例、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジンなど）を含んでいて良い。また、「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」は、糖部分が修飾されていてもよく、1個以上の水酸基がハロゲンや脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてもよい。

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、例えば硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性の核酸などが挙げられる。本発明のアンチセンス核酸は、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにすること、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高めること、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにすること、アンチセンス核酸の毒性をより小さな

ものにすること等を目的として修飾されうる。

このような修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 5 1993 などに記載されている。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、さらに、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加形態で与えられることができる。

10 ここで、付加形態において用いられる付加物としては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体；細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性物質が挙げられる。該脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、15 コール酸など）が好ましく、これらは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、さらに、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。

また、付加物としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼに20 よる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、例えばポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基などが挙げられる。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や25 生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明で用いられる蛋白質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配

列を有するアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレチド（例、DNA）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制し得る作用を有するポリヌクレオチドであればよい。該アンチセンスポリヌクレオチドとしては、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的な塩基配列（すなわち、本発明のポリヌクレオチドの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。

具体的には、配列番号：2 で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

また、5' 非翻訳領域または3' 非翻訳領域（好ましくは5' 非翻訳領域）の塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。具体的には、配列番号：5 または配列番号：6（好ましくは配列番号：5）で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなども挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40 個程度、好ましくは 15～30 個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスポリヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）

は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

- 5 本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればよく、また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、該DNAは、上記
- 10 した細胞・組織より調製したmRNA画分を用いて直接RT-PCR法によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

- (1) 配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：2で表わされるDNAとハイストリンジ
- 15 エントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の部分ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

- 20 配列番号：2で表わされるDNAとハイストリンジエントな条件でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 25 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅する方法、適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の

一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAで標識したDNAとハイブリダイゼーションさせる方法などが挙げられる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従ってハイブリダイゼーションを行なうことができる。

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-
10 LA PCR法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしての
15 ATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(i) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含む、例えばcDNAから目的とするDNA断片を切り出し、
20 (ii) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ここで、発現ベクターとしては、例えば大腸菌由来のプラスミド (例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13) ; 枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194) ; 酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15) ; λファージなどのバクテリオファージ ; レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バ
25 キュロウイルスなどの動物ウイルス ; pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

プロモーターは、特に限定されず、遺伝子の発現に用いる宿主に応じて適宜選択すればよい。該プロモーターとしては、例えば、動物細胞を宿主とし

て用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。

- 5 例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λP_L プロモーター、lppプロモーターなどが；宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが；宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、
- 10 ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

- 発現ベクターは、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40 ori と略称する場合がある）などを含有していてもよい。該選択マーカーとし
- 15 ては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfr と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ne o^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。

- CHO（dhfr⁻）細胞を宿主として使い、dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても目的遺伝子を選択できる。
- 20

- また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN末端側に付加してもよい。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列などが；宿主がバ
- 25 チルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが；宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして製造された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA
を含有するベクターを宿主に導入することによって、形質転換体を製造する
ことができる。

ここで、宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、
5 昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)
K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・
サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) ,
60 巻, 160 (1968)] , JM103 [ヌクイレック・アシツ・リサーチ, (Nucleic
10 Acids Research) , 9 巻, 309 (1981)] , JA221 [ジャーナル・オブ・モレキ
ュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120 巻, 517 (1978)] ,
HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)] ,
C600 [ジェネティックス (Genetics) , 39 巻, 440 (1954)] , DH5 α [Inoue,
H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)] , DH10B [プロ
15 シーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・
オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 87 巻, 4645-4649
(1990)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*)
MI114 [ジーン, 24 巻, 255 (1983)] , 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオ
20 ケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95 巻, 87 (1984)] などが用い
られる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスイエ (*Saccharomyces
cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12 ; シゾサッカロマイ
セス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036 ; ピキア
25 パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼
虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; S f 細胞) 、 *Trichoplusia*
ni の中腸由来の MG 1 細胞、 *Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM 細胞、
Mamestra brassicae 由来の細胞、 *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いら

れる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217 (1977)) などが用いられる。

- 5 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315 巻, 592 (1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

- 10 エシェリヒア属菌の形質転換は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69 巻, 2110 (1972)やジーン (Gene), 17 巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌の形質転換は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168 巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 20 酵母の形質転換は、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75 巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 昆虫細胞または昆虫の形質転換は、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞の形質転換は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

さらに、該形質転換体を、宿主に応じた培地中で培養することによって、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造することができる。

- 5 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際に使用される培地としては液体培地が好ましい。このような培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有していることが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩
- 10 類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、培地は、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを含有してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～8である。

- 15 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する際に用いられる培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。該培地には、プロ
- 20 モーターを効率よく働かせることを目的として、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えてもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

- 25 宿主がバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際に用いられる培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシ

ズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77 巻, 4505 (1980) ; 0.5% カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81 巻, 5330 (1984) 」 5 などが挙げられる。培地のpHは約5~8であることが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際に用いられる培地としては、例えば、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー 10 (Nature) , 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが挙げられる。培地のpHは約6.2~6.4であることが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際に用いられる培地としては、 15 例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science) , 122 巻, 501 (1952)] ; DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology) , 8 巻, 396 (1959)] ; RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)] , 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・ 20 フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73 巻, 1 (1950)] などが挙げられる。培地のpHは約6~8であることが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明の 25 G蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

このようにして得られる本発明のレセプター蛋白質は、例えば下記の方法により分離精製することができる。

例えば形質転換体の培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解など

によって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により、本発明のレセプター蛋白質の粗抽出液を得ることができる。ここで、緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤などを含んでいてもよい。

- 5 形質転換体の培養時に培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、培養上清を集めることにより、本発明のレセプター蛋白質を分離することができる。

- このようにして得られた粗抽出液あるいは培養上清を、公知の分離・精製法に付すことにより、レセプター蛋白質を精製することができる。ここで、
10 公知の分離、精製法としては、例えば塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法；逆相高速液体クロマト
15 グラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることができる。

- このようにして得られるレセプター蛋白質が遊離体である場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができる。また、
20 レセプター蛋白質が塩である場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- なお、形質転換体が産生するレセプター蛋白質に、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該蛋白修飾酵素としては、例えば、
25 トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

このようにして得られる本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

- 5 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

- 10 以下に、本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体の製造法について詳述する。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞（ハイブリドーマ）の作製

- 15 本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して、投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを用いてもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、
20 マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 25 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された哺乳動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256巻、495頁（1975年）〕に従い実施することができる。融合操作の際に融合促進剤を

用いてもよく、このような融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられる。なかでも、PEGが好ましい。

5 骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。

抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度である。融合操作は、10～80％程度の濃度のPEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）の存在下、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく実施できる。

10 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、公知の方法にしたがって行われる。このような方法としては、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、
15 抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法；抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

20 モノクローナル抗体の選別は、公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って、選別および育種用培地を用いて行なうことができる。モノクローナル抗体の選別は、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なわれる。

25 選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地であっても良く、具体的には、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などが用いられる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週

間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の分離精製

- 5 モノクローナル抗体の分離精製は、公知の免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

10 〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 本発明のポリクローナル抗体は、公知の方法あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。本発明のポリクローナル抗体は、例えば、免疫抗原（本発明のレセプター蛋白質等の抗原）を用いて、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。上記免疫抗原（本発明のレセプター蛋白質等の抗原）は、キャリアー蛋白質との複合体であってもよい。
- 15

- この際、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアー蛋白質と免疫抗原との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫した免疫抗原に対して抗体が効率良くできれば特に限定されない。例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等のキャリアー蛋白質を、免疫抗原1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の重量比でカップリングすることが好ましい。
- 20

- 免疫抗原とキャリアー蛋白質とのカップリングは、種々の縮合剤を用いて行うことができる。該縮合剤としては、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。
- 25

免疫抗原（免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体を含む）は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに

に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを用いてもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、前記した公知の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、

- (1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、
- (2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、
- (3) 遺伝子診断薬、
- (4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
- (5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、
- (6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法、
- (7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、
- (8) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、
- (9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、
- (10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
- (11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、
- (12) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、
- (13) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒトトランスジェニック動物の作出などに用い

ることができる。

特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カンナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニン ジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアチン、プロ

- スタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CKI/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3ケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸など）、リゾホスファチジルセリン、スフィンゴシルホスホリルコリン、リゾホスファチジルコリン、ステロイド類、胆汁酸類、イソプレノイド、アラキドン酸代謝物、アミン類、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。
- 具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

5 より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質
10 またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

15 ③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

20 ④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質
25 またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例え

ば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、上記の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現させることが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片としては、通常、cDNAが用いられるが、必ずしもこれに限定されるものではなく、例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法、例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において用いられる本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、公知の方法に従っ

て精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分であってもよい。

5 本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化は、公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞とは、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞を意味するが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

10 前記細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分を意味する。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica 社製）による破碎方法、超音波による破碎方法、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎方法などが挙げられる。このようにして得られる細胞膜は、分画遠心分離法や
15 密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法などにより分画することができる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、沈殿を採取することにより、細胞膜画分を得ることができる。該細胞膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。
20

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 分子、さらに好ましくは $10^5 \sim 10^7$ 分子である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比
25 活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試験化合物をスクリーニングできる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 5 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ または $[^{35}\text{S}]$ などの標識体でそれぞれ標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カンナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27、PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、
- 10 カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー
- 15 （例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3ケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリ
- 20 ペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸、リゾホスファチジルセリン、スフィンゴシルホスホリルコリン、リゾホスファチジルコリン、ステロイド類、胆汁酸類、イソプレノイド、アラキドン酸代謝物、アミン類、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸などが好適である。
- 25

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、適宜のバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。該バッファーは、pH 4~10（望ましくはpH 6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであれば特に限定されない。

また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えてもよい。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で、PM SF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤をバッファーに加えてもよい。

このようにして得られたレセプター標品 0.01~10 ml に、一定量（5000~500000 cpm）の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] など で標識した試験化合物を共存させる。一方、対照群においては、非特異的結合量（NSB）を知るために、標識した試験化合物の代わりに大過剰の未標識の試験化合物を共存させる。レセプター標品と試験化合物との反応は、約 0℃~50℃、望ましくは約 4℃~37℃で、約 20 分~24 時間、望ましくは約 30 分~3 時間行なわれる。反応後、ガラス繊維濾紙等で反応液を濾過し、ガラス繊維濾紙を適量のバッファー（レセプター標品と同様のバッファー）で洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。得られる計測値を用い、全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が 0 cpm を越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記④または⑤において、細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca²⁺遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-

f o s の活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）は、公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

- 具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地
5 あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって確認できない場合には、該分解酵素に対する阻害剤を添加し
10 てアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレ
15 セプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

- 20 Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径 0.45 μ m のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

- 25 本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12 穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5% CO₂、95% air で2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などと標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。水に難溶性の試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

- 5 標識化合物と同じものを100~1000倍高い濃度に調製する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

- 10 ②標識試験化合物を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μ l加えておく。

③反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

- 15 ④液体シンチレーションカウンター（ベックマンコールター社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、視床下部、大脳皮質、結腸癌、肺癌、心臓、胎盤、肺などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、
 20 ボンベシン、カンナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27、PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ
 25 インテストINAL アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NA

P-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP10、Mig、PBSF/SDF-1
などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP
-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、
HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、I-309、TARC、MIPF
5 -1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカ
インサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；
fractalkineなどのCX3ケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エ
ンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアテ
ィックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフ
10 ィンゴシン1-リン酸、リゾホスファチジルセリン、スフィンゴシルホスホ
リルコリン、リゾホスファチジルコリン、ステロイド類、胆汁酸類、イソプ
レノイド、アラキドン酸代謝物、アミン類、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌク
レオシド、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸などが挙げられる。

15 (2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患
の予防および／または治療剤

上記(1)の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが
明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター
蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを、本発明のレセプ
20 ター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医
薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が欠損または減少して
いるためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の機能
不全）患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該
25 レセプター蛋白質の量を補充したり、②(i) 本発明のレセプター蛋白質をコ
ードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ii)
対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発
現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内に
おけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させ

ることができる。すなわち、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

5 本発明のレセプター蛋白質は、5HT_{1D}（セロトニンレセプター）にアミノ酸配列レベルで、27％程度の相同性が認められる新規7回膜貫通型レセプター蛋白質である。

10 本発明のレセプター蛋白質または該レセプター蛋白質をコードするDNAは、中枢疾患（例えば、鬱病、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）、心疾患（例えば、狭心症、心筋梗塞など）などの予防および／または治療に有用な医薬として用いられる。

15 本発明のレセプター蛋白質を医薬として使用する場合は、製剤技術分野において慣用の方法に従って製剤化することができる。

20 一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを医薬として使用する場合は、本発明のDNAをそのまま、あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、本発明のレセプター蛋白質と同様にして製剤化することができる。なお、本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。

25 上記医薬の剤形としては、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などの経口剤；注射剤などの非経口剤などが挙げられる。これらの製剤は、例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを、製剤添加剤、例えば生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに混合することによって製造できる。これら製剤における本発明のレセプター蛋白質またはDNAの含量は、後述する本発明のレ

セプター蛋白質またはDNAの投与量を考慮して、適宜決定される。

例えば錠剤およびカプセル剤を製造する際に用いられる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムなどの結合剤；結晶性セルロースなどの賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などの膨化剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ショ糖、乳糖またはサッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、アカモノ油またはチェリーなどの香味剤などが用いられる。カプセル剤は、上記添加剤以外に、さらに油脂のような液状担体を含有していてもよい。

注射剤を製造する際に用いられる添加剤としては、例えば、注射用水、生理食塩水などの水性ベヒクル；ゴマ油、ヤシ油、大豆油などの植物油などの油性ベヒクルなどが挙げられる。水性ベヒクルを用いる場合には、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなどの等張化剤；アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などの溶解補助剤を用いてもよい。油性ベヒクルを用いる場合には、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどの溶解補助剤を用いてもよい。注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

製剤添加剤としては、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤なども挙げられる。

このようにして得られる製剤は低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して安全に投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1~100 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ましくは約 1.0~20 mgである。非経口投与の場合、本発明のレセプター

蛋白質の投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20 mg、より好ましくは約 0.1~10 mg をである。

5 本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などに
より異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、
一日あたり約 0.1~100 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ましくは
約 1.0~20 mg である。非経口投与の場合、本発明のDNAの投与量は、例
え、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者（体重 60 kg と
して）に対して、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20 mg、
10 より好ましくは約 0.1~10 mg である。

(3) 遺伝子診断薬

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳
動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、
15 サルなど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコ
ードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができ
るので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低
下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬
として有用である。

20 本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハ
イブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）,
第5巻, 874~879 頁（1989 年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・
アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of
the National Academy of Sciences of the United States of America）,
25 第86巻, 2766~2770 頁（1989 年））などにより実施することができる。

(4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化さ
せる化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプタ

一蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肺、大腸など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30

分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後(1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後)、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(a) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(b) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した本発明のレセプター蛋白質の場合と同様にして、各種製剤とすることができる。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1~100 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ましくは約 1.0~20 mg である。非経口投与の場合、該化合物またはその塩の投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20 mg、より好ましくは約 0.1~10 mg である。

- 15 (5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

- 20 本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

- 25 ここで、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患としては、例えば中枢疾患（例えば、鬱病、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）、心疾患（例えば、狭心症、心筋梗塞など）などが挙げられる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防お

よび／または治療剤として使用する場合は、該化合物を、上記した本発明のレセプター蛋白質の場合と同様にして、各種製剤とすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、

5 イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口投与の場合、該化合物またはその塩の
10 投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌症患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.01～30 mg、好ましくは約 0.1～20 mg、より好ましくは約 0.1～10 mg である。

(6) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法
15 本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって実施することができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法
20 に従って、本発明の定量法を実施することができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和 49 年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和 54 年発行）

25 (7) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を變化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法
本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を變化

させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（a）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（b）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（c）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（d）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（a）の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法は、（i）と（ii）の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質

質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触
5 させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、
10 標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
15 法、

④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に
20 接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと
25 本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質

質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際に直接的にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のマウス由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が

極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたマウス由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、
5 本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現させることが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片にはcDNAが用いられるが、必ずしもこれに限定されるものではなく、例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を、昆
10 虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレ
15 セプターの量と質の検査は、公知の方法、例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法において用いられる「本発明のレセプター蛋白質等」は、公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等、該レセプター蛋白質等を含有する細胞、該レセプター蛋白質等を含有する細胞膜画分の
20 いずれであってもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化は、公知の方法に従って行なうことができる。

25 上記「本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞」および「細胞膜画分」としては、前記本発明のリガンド決定方法において記載したものが用いられる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 分子、さらに好ましくは $10^5 \sim 10^7$ 分子

である。なお、発現量が多いほど膜面当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試験化合物をスクリーニングできる。

5 リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用
10 などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質
15 等を含む細胞または細胞の膜画分を、適宜のバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。該バッファーは、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであれば特に
20 限定されない。

また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えてもよい。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で、PMSF、ロイペプチン、E-6.4（ペプチド研究所製）、
25 ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤をバッファーに加えてもよい。

このようにして得られたレセプター蛋白質標品 0.01～10 ml に、一定量（5000～500000 cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4} ～ 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。一方、対照群においては、非特異的結合量（NSB）を知るために、標識したリガンドの代わりに大過剰の未標識のリガン

ドを共存させる。レセプター蛋白質標品と試験化合物または標識したリガンドとの反応は、約 0℃から 50℃、望ましくは約 4℃から 37℃で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行なわれる。反応後、ガラス繊維濾紙等で反応液を濾過し、ガラス繊維濾紙を適量のバッファー（レセプター蛋白質標品と同様のバッファー）で洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。得られる計測値を用い、拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を 100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の④または⑤において、細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）は、公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現し

た細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [^3H]、[^{125}I]、[^{14}C]、[^{35}S] などで標識したリガンド水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現C

H₂O細胞を、測定用緩衝液 1 ml で 2 回洗浄した後、490 μ l の測定用緩衝液を各穴に加える。

- ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ M の試験化合物溶液を 5 μ l 加えた後、標識リガンドを 5 μ l 加え、室温にて 1 時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} M のリガンドを 5 μ l 加えておく。

③ 反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを 0.2 N NaOH-1% SDS で溶解し、4 ml の液体シンチレーター A (和光純薬製) と混合する。

- ④ 液体シンチレーションカウンター (ベックマンコールター社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

- B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(a) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca²⁺遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を有する化合物 (いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(b) 該細胞刺激活性を有しない化合物 (いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(c) リガンドと本発明の G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは (d) リガンドと本発明の G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、

発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているの
5 該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活
10 性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した本発明のレセプター蛋白質の場合と同様にして、各種製剤とすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。
20

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1~100 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ましくは約 1.0~20 mgである。非経口投与の場合、該化合物またはその塩の投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20 mg、より好ましくは約 0.1~10 mgである。
25

(8) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変

化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば中枢機能、循環機能、消化機能、心機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）や本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドは、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

ここで、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患としては、例えば中枢疾患（例えば、鬱病、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）、心疾患（例えば、狭心症、心筋梗塞など）などが挙げられる。

該化合物やリガンドを本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、該化合物やリガンドを、上記した本発明のレセプター蛋白質の場合と同様にして、各種製剤とすることができる。

さらに、上記予防・治療剤は適当な薬剤と組み合わせて例えば本発明のレセプター蛋白質が高発現している臓器や組織を特異的なターゲットとしたDDS製剤として使用することもできる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口投与の場合、該化合物またはその塩の

投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者（体重 60 kg）に対しては、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20 mg、より好ましくは約 0.1~10 mg である。

5 (9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の
定量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明
10 は、例えば、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供する。
15

上記 (ii) においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等の C 端部に反応する抗体であることが好ましい。
20

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と略記することがある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるず、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、い
25

ずれの測定法を用いてもよい。該測定法としては、例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法が特に好ましい。

5 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例
10 えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

15 抗原あるいは抗体を不溶化する場合には、物理的吸着や、通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化または固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法などが用いられる。物理的吸着に用いられる担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類；ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂；ガラス等が挙げられる。

20 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（一次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（二次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。一次反応と二次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。ここで、標識化剤としては前記と同様のもの
25 が用いられる。また、不溶化は前記と同様にして行われる。

サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、

一次反応と二次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、一次反応および二次反応に用いられる抗体は、例えば、二次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のC端部を認識する場合、一次反応で用いられる抗体は、C端部以外、例えばN端部を認識することが好ましい。

本発明のモノクローナル抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、F何れかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法；および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用地第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法が用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、何れかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合には、レーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に、当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。このような技術的配慮については、総説、成書などを参照することができる。具体的には、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジ

オイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンザイモロジー」(Methods in ENZYMOLOGY) Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照できる。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリ

ーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプター蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプター蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、拒癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的スト

レス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肺、大腸など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、
5 リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX-100™、Tween-20™ など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く
10 含まれる画分を意味する。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica 社製）のよる破碎方法；超音波による破碎方法；フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎方法などが挙げられる。このようにして得られる細胞膜の分画には、分画遠心分
15 離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法などにより分画することができる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000 r p m）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000 r p m）で通常30分～2時間遠心し、沈澱を採取することにより、細胞膜画分を得ることができる。該細胞膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリ
20 ン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様に行なうことができ、
25 ウエスタンブロット解析は公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従って作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を

変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、
5 投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

10 (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド
15 の確認は具体的には以下のようにして行なう。

(iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、
20 一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、心臓、胎盤、肺など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該レセプター蛋白質の染色度合いを定量化す
25 ることにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（a）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、
- 5 G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（b）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。
- 10

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 15 該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬
- 20 組成物として使用する場合、該化合物またはその塩を、上記した本発明のレセプター蛋白質の場合と同様にして、各種製剤とすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者（体重60 kg）に対して、一日あたり約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口投与の場合、該化合物またはその塩の投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者（体

重 60 k g) に対して、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20 mg、より好ましくは約 0.1~10 mg である。

(11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド
5 の量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、心臓または中枢機能
など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、
細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変
化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の
10 予防および／または治療剤として用いることができる。

ここで、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患としては、
例えば中枢疾患(例えば、鬱病、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、
内分泌疾患(例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能
異常など)、代謝疾患(例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など)、癌(例
15 えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、
結腸癌、直腸癌など)、心疾患(例えば、狭心症、心筋梗塞など)などが挙
げられる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防およ
び／または治療剤として使用する場合は、該化合物を、上記した本発明のレ
20 セプター蛋白質の場合と同様にして、各種製剤とすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや
哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、
イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法
25 などにより異なるが、経口投与の場合、例えば、癌患者(体重 60 k g)に対
して、一日あたり約 0.1~100 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ま
しくは約 1.0~20 mg である。非経口投与の場合、該化合物またはその塩の
投与量は、例えば、注射剤を静脈注射する場合には、通常例えば、癌患者(体
重 60 k g)に対して、一日あたり約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~20

mg、より好ましくは約 0.1~10 mg である。

(12) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

- 5 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、すなわち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例
10 えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。したがって、中和活性を有する本発明の抗体は、該レセプター蛋白質の過剰発現など
15 に起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

(13) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を有するトランスジェニック動物の作出

- 本発明の DNA を用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランス
20 ジェニック動物を作出することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する場合がある）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

- 本発明の DNA を対象動物に導入するにあたっては、該 DNA を動物細胞
25 で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明の DNA を導入する場合、これと相同性が高い動物由来の本発明の DNA を動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレ

セプター蛋白質等を高産生するDNA導入動物を作出できる。該プロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターなどが用いられるが、心臓で特異的に発現する遺伝子のプロモーターが好ましい。

- 5 受精卵細胞段階における本発明のDNAの導入は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

- 10 本発明のDNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが導入された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現しているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

- 20 本発明のDNA導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等を分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、本発明のレセプター蛋白質等の高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製
- 25

することも可能である。

(14) アンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の機能を抑制することができるので、例えば、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

ここで、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患としては、例えば中枢疾患（例えば、鬱病、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）、心疾患（例えば、狭心症、心筋梗塞など）などが挙げられる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該アンチセンスポリヌクレオチドを、上記した本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの場合と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は低毒性であり、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

なお、該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進の補助剤などの生理学的に認められる担体とともに、遺伝子銃やマイクロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、癌の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを臓器（例、肝臓、肺、心臓、腎臓など）に局所投与する場合、成人（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1～100 mg である。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

5 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、その表示は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものである。その例を以下に示す。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

10	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
15	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
20	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
25	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン

- pGlu : ピログルタミン酸
 Me : メチル基
 Et : エチル基
 Bu : ブチル基
 5 Ph : フェニル基
 TC : チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

- Tos : p-トルエンスルフォニル
 10 CHO : ホルミル
 Bzl : ベンジル
 Cl₂Bzl : 2,6-ジクロロベンジル
 Bom : ベンジルオキシメチル
 Z : ベンジルオキシカルボニル
 15 Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
 Boc : t-ブトキシカルボニル
 DNP : ジニトロフェノール
 Trt : トリチル
 20 Bum : t-ブトキシメチル
 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
 HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
 HOObt : 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
 1,2,3-ベンゾトリアジン
 25 HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボ
 キシイミド
 DCC : N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号：1

本発明のマウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR38のアミノ酸配列を示す。

配列番号：2

- 5 本発明のマウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR38をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号：3

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

- 10 配列番号：4

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

配列番号：5

- 15 本発明のマウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR38をコードするDNAの5'非翻訳領域の塩基配列を示す。

配列番号：6

本発明のマウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR38をコードするDNAの3'非翻訳領域の塩基配列を示す。

- 20 以下の実施例1で得られた形質転換体、大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-TGR38 は、2001年(平成13年)4月19日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7554として、2001年(平成13年)4月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発
- 25 酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16614として寄託されている。

実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明

の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

実施例1 (マウス脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする

5 cDNAのクローニングと塩基配列の決定)

マウス脳 cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応では、上記 cDNA 3 μ l、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH 社) 1 μ l、プライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) 10 各 0.5 μ M、dNTPs 200 μ M、および Advantage-GC2 Polymerase Mix に添付のバッファー 10 μ l、GC Melt 5 μ l からなる反応液 50 μ l を用いた。また、PCR 反応では、95 $^{\circ}$ C・1 分反応の後、95 $^{\circ}$ C・30 秒、68 $^{\circ}$ C・2 分反応のサイクルを 5 回、95 $^{\circ}$ C・30 秒、66 $^{\circ}$ C・30 秒、68 $^{\circ}$ C・2 分反応のサイクルを 5 回、95 $^{\circ}$ C・30 秒、64 $^{\circ}$ C・30 秒、68 $^{\circ}$ C・2 分反応のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 68 $^{\circ}$ C・15 7 分反応を行った。

PCR 反応産物を TOPO-TA クローニングキット (Invitrogen 社) に記載の方法に従って、プラスミドベクター pCR2.1 (Invitrogen 社) へサブクローニングした。得られるプラスミドベクターを大腸菌 TOP10 に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地に加えて、cDNA を持つクローンを選択した。個々のクロー 20 ンの配列を解析した結果、新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA 配列 (配列番号: 2) を得た。

該 cDNA 配列を翻訳して得られるアミノ酸配列を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を TGR38 と命名した。さらに、その形質転換体は大腸菌 (Escherichia coli) TOP10/pCR2.1-TGR38 と命名した。

25

産業上の利用可能性

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド (例えば、DNA、RNA およびそれらの誘導体) は、①リガンド

- (アゴニスト)の決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作出または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。
- 5

請求の範囲

1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
2. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
3. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
4. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：2で表される塩基配列を有する請求項5記載のポリヌクレオチド。
7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
10. 10. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
11. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
12. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
13. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項12記載の抗体。
14. 請求項12記載の抗体を含有してなる診断薬。
15. 15. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項1記

載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。

16. 請求項15記載のリガンドを含有してなる医薬。

17. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載の

5 G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

18. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 19. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

20. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

21. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

22. 請求項4記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

23. 請求項4記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

24. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法。

25. 請求項12記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のG

蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法。

26. 請求項24または請求項25記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法。

- 5 27. 請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

28. 請求項25記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
10

29. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

30. 請求項28記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩。
15

31. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

32. 請求項28記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。
20

33. 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌または心疾患の予防・治療剤である請求項21、請求項31または請求項32のいずれかに記載の医薬。

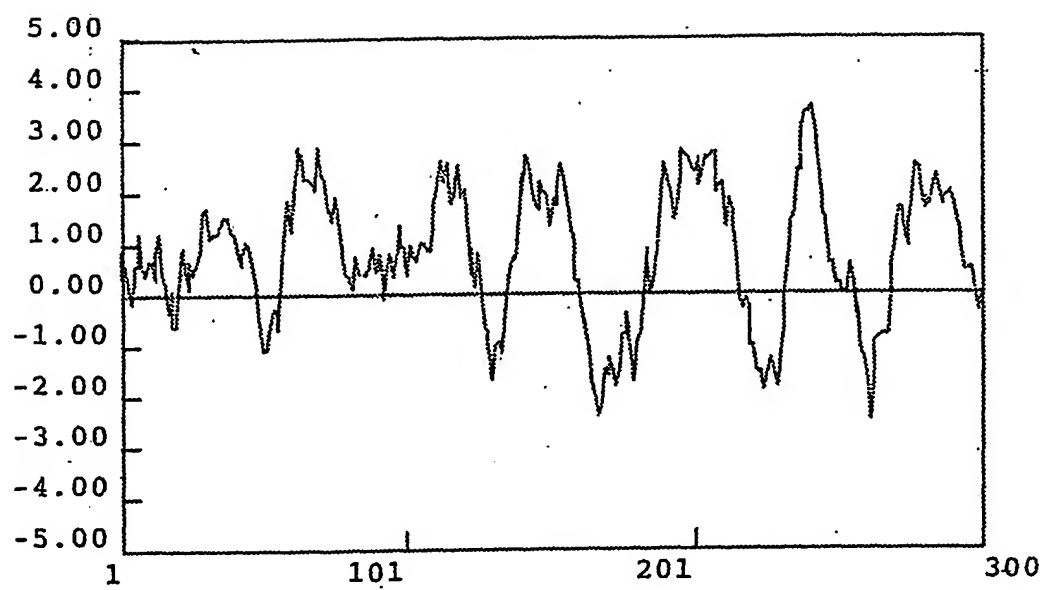
34. 哺乳動物に対して、請求項20、請求項29または請求項30のいずれかに記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする、該哺乳動物における中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌または心疾患の予防・治療方法。
25

35. 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌または心疾患の予防・治療剤を

製造するための、請求項 20、請求項 29 または請求項 30 のいずれかに記載の化合物またはその塩の使用。

1 / 1

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein-Coupled Receptor Protein and its DNA

<130> 2900W00P

<150> JP 2001-132201

<151> 2001-04-27

<160> 6

<210> 1

<211> 299

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Asp Val Met Asp Val Asp Leu Val Ser Asn Gly Ser Ser Val Val

5

10

15

Met Pro Met Ala Glu Gln Val Cys Asp Ala His Cys Arg Ala Ile Leu

20

25

30

Thr Thr Ala Tyr Ser Val Val Phe Phe Gly Gly Thr Val Gly Thr Val

35

40

45

Met Met Ser His Met Met Phe Lys Arg Asn Cys Gln Ser Met Ile Ala

50

55

60

Thr Ile Ile Ile Asn Ile Ile Val Leu His Ser Leu Leu Leu Ile Ser

65

70

75

80

Leu Pro Phe Arg Leu Ser Tyr Tyr Leu Ser Ala Val Trp Lys Leu Gly

85

90

95

Ser Phe Thr Cys Arg Met Val Ser Gly Val Ile Tyr Gly His Met Tyr

100

105

110

Leu Thr Phe Ile Phe Tyr Val Ala Ile Val Thr Leu Arg Leu Leu Ile

115

120

125

Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Met Gln Gln Leu Gln Lys Phe His Ala Val

130 135 140
 Ala Leu Ser Ile Ile Ile Trp Val Thr Gly Ser Phe Ile Phe Leu Pro
 145 150 155 160
 Ile Phe Phe Leu Gln Tyr Gly Thr Asp Pro Ser Tyr Thr Glu Gln Gln
 165 170 175
 Arg Cys Phe Glu Phe His Lys Ser Leu Asn Ser Arg Asp Ile Ile Ile
 180 185 190
 Ile Asn Tyr Ser Ile Ile Val Ile Met Met Thr Thr Val Leu Leu Leu
 195 200 205
 Phe Leu Ile Gln Met Ala Val Ile Leu His Leu Ile Lys Ala Tyr Trp
 210 215 220
 Pro Asp Met Trp Ala His Gln Glu Tyr Arg Ala Gln Ile Lys Ser Phe
 225 230 235 240
 Phe Phe Leu Leu Val Ile Val Val Cys Phe Ile Pro His His Ala Phe
 245 250 255
 Arg Val Tyr Phe Ile Gln Asn Phe Pro Glu Gln Glu Asn Ser Lys Leu
 260 265 270
 Ile Leu Tyr Asn Glu Ile Cys Val Ala Leu Thr Ala Phe Cys Cys Leu
 275 280 285
 Asp Met Leu Cys Phe Ile Gly Gly Val Ile His
 290 295

<210> 2

<211> 897

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

atggatgtga tggatgtaga cctcgtgtca aatggctcaa gtgtggtgat gcctatggca 60
 gagcaagtct gtgatgctca ctgcagagca attctgacaa cagcctatag tgtggtcttc 120
 ttiggaggca ccgttggaac agttatgatg tcacacatga tgttcaagag gaattgccaa 180

tcaatgatig ccactatcat cattaatatc atigtgttgc actcccttct cctgattagt 240
 ctgccattcc gccicagtta ctatctctca gcagctigga agcttgggtc ttttacctgc 300
 cgaatgggta gggcgctcat atatgggcat atgiacctta ccttcatitt ttaigtggcc 360
 attgttacct ttggctgct catctatitt aagaaactgc aaatgcaaca gttacaaaag 420
 ttccatgccg tggctctaag tattattatt tgggtgacag gaagcttcat ctttttacca 480
 atatittitt tacaataigg cacagatcca agtatatag agcaacagcg gtgccttgag 540
 ttcataaat ctctcaactc cagggacatc atcatcataa actattctat aattgttatt 600
 atgatgaaa cagttctgct cctctttctg atacagatgg ctgctattct tcatttgata 660
 aaagcctatt ggcttgatat gggggcccat caagagtaca gagctcaaat caagagtttt 720
 ttcttccigt tggctatagt tgtctgcttt ataccccacc atgcattcag ggtatatttt 780
 atcaaaaatt ttccagagca agaaaattct aagttaattc tgtacaatga aatctgtgtt 840
 gctttaacag ctttctgctg cctggatatg ttaigtitca taggtggtgt catccat 897

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

atggatgiga tggatgtaga cctc 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

ciaatggaig acaccaccta tgaa 24

<210> 5

<211> 202

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 5

```

tcactcttgt.cttcaggatg ttagaattac tgggcagaat ttacaacagt acttcttttg 60
tgigatttca agattttgaa agagtcctca aggattgaaa agttcaatat ctatacatga 120
gigcattgtt tcagtatgtc aalcataact ttgtaaaact ttigatttga cagtttgigg 180
tctaatttct ccacgatcaa cc 202

```

<210> 6

<211> 1006

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

```

agcttcccg tgcctttctg tgattggttt ataggccatc atgatgaaaa atacttcagt 60
tgaatggatg gagtgctatt attgtattta aaattttgaa gctctcigct cccgaacatc 120
agactttttt atttctctta gccacaattg tttcttttca aaaacttaat caaccctagt 180
tatctacttt tccittgaga atgcttgtag gccccaaatg tatcccagaa tatgttgggt 240
ttcttagctg taccaaacac actattcctt cctctttgcg tttcattcag tattcacttc 300
aaccacgcat accgtgagt tctccccata ctcttgaggc ttctagccaa ccatgtttc 360
ctctgaatat gtttgctccc ccttccattc ttatccacca aaatttagat aacctatagt 420
tataaatgag gctctaaaaat agccttaagc tattaaaaat aagatttcct gccataaatt 480
gcattgggag tagagtatta ctttgagcag agatgtcaag aaagttagaa gaaactcttc 540
caagagactg ggcatctaca tgcctcatcc tgttgaaggc acagaaagga ctiggaagcc 600
agaggttacc tctgatcta ctttcagtac aaaacagtaa aagacattgg aaatgacaaa 660
aaatatgacc aaaccaaacc aacccccac ctgtctacca ccaccaccac caccaccaac 720
aacaacaaca acaacaaaaa acttgacctg ggctgagctt gccacaaaac tctttggcca 780
caaaccttga ggccatatag ctctttttat aatttttcag gacacctat gctttcaaga 940
accatcatat aattaaaagc agtactcatt ctgtcacact taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1000
aaaaaa 1006

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C07K14/705, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18,
C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50, C12Q1/68, A61K38/17, A61K31/711,
A61P3/00, A61P5/00, A61P9/00, A61P25/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C07K14/705, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBL/
DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 872550 A2 (SmithKline Beecham Corp.), 21 October, 1998 (21.10.98), & CA 2232861 A & JP 10-337182 A	1-14, 17-19, 22-25, 27-28
A	EP 711830 A2 (Takeda Chemical Ind., Ltd.), 15 May, 1996 (15.05.96), & CA 2160449 A & JP 9-48800 A	1-14, 17-19, 22-25, 27-28
A	EP 600278 A2 (Mitsubishi Kasei Corp.), 11 November, 1993 (11.11.93), & US 5502166 A & JP 6-157597 A	1-14, 17-19, 22-25, 27-28



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May, 2002 (16.05.02)

Date of mailing of the international search report

04 June, 2002 (04.06.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04215

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26, 34

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 26 and 34 pertain to methods for diagnosis and treatment of diseases and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under

2. ☒ Claims Nos.: 15, 16, 20, 21, 29-33, 35

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the compounds as set forth in claims 15, 16, 20, 21, 29 to 33 and 35, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope thereof and what are not. Namely, these claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful opinion can be

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.


PCT/JP02/04215

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

the PCT, to search.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

presented on the novelty, inventive step and industrial applicability of the inventions as set forth in the above claims and claims depending on these claims.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C07K14/47, C07K14/705, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50, C12Q1/68, A61K38/17, A61K31/711, A61P3/00, A61P5/00, A61P9/00, A61P25/00, A61P35/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C07K14/47, C07K14/705, C12N15/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE (STN), EMBL/DBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 872550 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 1998. 10. 21 & CA 2232861 A & JP 10-337182 A	1-14, 17-19, 22-25, 27-28
A	EP 711830 A2 (TAKEDA CHEMICAL IND., LTD.) 1996. 05. 15 & CA 2160449 A & JP 9-48800 A	1-14, 17-19, 22-25, 27-28
A	EP 600278 A2 (MITSUBISHI KASEI CORP.) 1993. 11. 11 & US 5502166 A & JP 6-157597 A	1-14, 17-19, 22-25, 27-28
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16.05.02		国際調査報告の発送日 04.06.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 26, 34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲26, 34に係る発明は疾患の診断・治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 15, 16, 20, 21, 29-33, 35 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲15, 16, 20, 21, 29-33, 35に記載の化合物については、化合物として具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲及びそれを引用する各請求の範囲に記載された発明に係る新規性、進歩性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。